

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 750 136

21 N° d'enregistrement national : 96 07846

51 Int Cl⁶ : C 07 H 21/00, C 08 G 73/06, C 12 Q 1/68, G 01 N 27/327

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 25.06.96.

30 Priorité :

43 Date de la mise à disposition du public de la demande : 26.12.97 Bulletin 97/52.

56 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

71 Demandeur(s) : CIS BIO INTERNATIONAL SOCIETE ANONYME — FR.

72 Inventeur(s) : MARCHAND JOSEPH et BAZIN HERVE.

73 Titulaire(s) : .

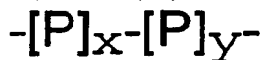
74 Mandataire : CABINET ORES.

54 CONJUGUES D'UN OLIGONUCLEOTIDE/POLYMERE CONDUCTEUR ELECTRONIQUE AVEC UNE MOLECULE D'INTERET, ET LEURS UTILISATIONS.

57 L'invention est relative à une macromolécule de formule (I):

P-O-M

ainsi qu'à un copolymère de formule (II):



(II)

dans lesquelles:

M représente une molécule d'intérêt;

O représente une chaîne oligonucléotidique;

P représente un monomère d'un polymère conducteur électronique, et x et y représentent des nombres entiers égaux ou supérieurs à 1.

FR 2 750 136 - A1



CONJUGUES D'UN OLIGONUCLEOTIDE/POLYMERE CONDUCTEUR ELECTRONIQUE AVEC UNE MOLECULE D'INTERET, ET LEURS UTILISATIONS.

La présente invention est relative à de nouvelles méthodes et de nouveaux composés permettant de contrôler la fixation de différentes molécules d'intérêt sur un polymère conducteur électronique (PCE) ;

La demande PCT WO 94/22889 au nom de CIS BIO INTERNATIONAL (Inventeurs TEOULE et al.), décrit la fixation d'oligonucléotides sur un support constitué d'un polymère conducteur électronique (PCE).

Cette fixation peut s'effectuer de différentes manières :

1) Par fixation d'un oligonucléotide présynthétisé sur le PCE (soit par réaction chimique de l'oligonucléotide sur le PCE préalablement fonctionnalisé, soit par copolymérisation des monomères de PCE avec le produit de condensation de l'oligonucléotide sur un desdits monomères).

2) Par élongation de l'oligonucléotide à partir d'un nucléoside, d'un nucléotide, ou d'un oligonucléotide déjà fixé au PCE, en utilisant par exemple une des méthodes classiques de synthèse des acides nucléiques.

La fixation d'oligonucléotides sur des PCE permet de faciliter l'obtention et l'utilisation de matrices d'oligonucléotides, qui sont en particulier utilisables pour le séquençage des acides nucléiques et le diagnostic.

De même que les matrices d'oligonucléotides, les matrices de peptides, et de manière plus générale, des matrices de diverses molécules constituent en effet un outil particulièrement intéressant, par exemple dans le domaine du diagnostic, ou pour le criblage de molécules actives. Il serait donc souhaitable que

d'autres types de matrices puissent bénéficier des améliorations apportées par l'utilisation de PCE.

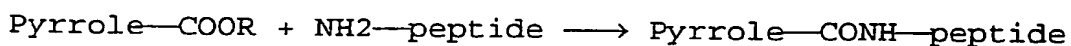
Toutefois, la fixation sur un PCE de molécules d'intérêt autres que les oligonucléotides, par exemple la
5 fixation de peptides, pose plus de problèmes que la fixation d'oligonucléotides.

En effet, bien que des méthodes de synthèse de pyrrole portant un aminoacide ou un dipeptide soient décrites dans la littérature [GARNIER et al. J. Am. Chem.
10 Soc., 116, 8813-8814 (1994)], il s'agit de méthodes de synthèse en solution qui, en pratique, ne permettent pas l'obtention, avec un rendement suffisant, de molécules peptidiques synthétiques de taille supérieure à 2 ou 3 acides aminés. Or, les molécules présentant un intérêt
15 réel dans le domaine du diagnostic ou celui du criblage de molécules actives sont plus longues ; par exemple, un motif antigénique « minimal » comporte habituellement une moyenne de 6 aminoacides.

Les méthodes habituelles de synthèse peptidique sur support solide, dérivées de la technique de MERRIFIELD, font intervenir différents groupes protecteurs des chaînes latérales des aminoacides. La coupure de ces groupes, ainsi que la séparation du peptide et du support à l'issue de la synthèse sont effectuées en milieu
20 acide fort (acide fluorhydrique ou acide trifluoracétique). Or, en milieu acide, les monomères de PCE, et en particulier le résidu pyrrole, ont tendance à polymériser, créant ainsi des sous-produits indésirables.

Il apparaît donc que ni la méthode de synthèse
30 en solution, dont les possibilités sont limitées à la synthèse de di- ou des tripeptides, ni la synthèse sur support, dont la mise en œuvre nécessite des conditions chimiques incompatibles avec la stabilité du résidu pyrrole, ne conviennent à la synthèse de peptides modifiés
35 par un résidu pyrrole.

Il est toutefois possible de greffer un monomère de PCE, par exemple un résidu pyrrole, sur un oligopeptide préformé issu d'une synthèse peptidique traditionnelle sur phase solide. Ce greffage peut se faire par des méthodes connues, par réaction entre un dérivé carboxylique du pyrrole (activé par un réactif de couplage) et une des fonctions amines disponibles d'un peptide (par exemple la fonction amine de l'extrémité N-terminale) suivant le schéma ci-dessous [S.E. WOLOWACZ et al., Anal. Chem., 64, 1541-1545, (1992)].



A l'issue de la réaction, il faut isoler le conjugué Pyrrole-peptide du mélange réactionnel contenant le peptide et le pyrrole n'ayant pas réagi, ainsi que les sels et sous-produits éventuels.

Les différentes méthodes dont on peut *a priori* envisager l'utilisation dans ce but, sont celles habituellement utilisées pour la purification des peptides, et en particulier les méthodes de chromatographie en phase inverse (RP-HPLC), ou de filtration sur gel.

La manière la plus simple de procéder à la détection des peptides à l'issue de la chromatographie, est de mesurer l'absorption dans l'ultraviolet, à une longueur d'onde de 215 nm à 220 nm ; en effet, à cette longueur d'onde tous les peptides absorbent la lumière. Cependant, cette mesure de l'absorption vers 215 nm présente l'inconvénient d'être peu sensible, et de ne pas être spécifique, car des solvants ainsi que des ions organiques ou inorganiques sont également détectés.

Il existe des méthodes permettant de détecter spécifiquement les peptides, par une réaction chimique (dérivatisation « en ligne ») à la sortie de la colonne de chromatographie. Cette méthode présente l'avantage d'augmenter la sensibilité de la détection, mais en alourdit la mise en œuvre, et en outre modifie irréversiblement le peptide ; cette modification peut en particu-

lier avoir des conséquences importantes sur ces propriétés fonctionnelles (par exemple son antigénicité).

Les problèmes exposés ci-dessus dans le cas des peptides se posent également pour la détection
5 d'autres molécules d'intérêt etc... En effet, de nombreuses substances, telles que les sucres, les polyosides, les stéroïdes, ou bien ne présentent pas d'absorption spécifique à une longueur d'onde déterminée en UV, ou bien ne présentent qu'une absorption faible, ce
10 qui nuit à la sensibilité de la détection.

On est alors amené à détecter, par un moyen physique ou chimique approprié, la présence de la molécule recherchée dans chaque fraction issue de la chromatographie, ce qui bien évidemment prend beaucoup de
15 temps ; en outre, cette analyse est souvent destructive de l'analyte concerné.

La présente Invention a pour but l'obtention de conjugués, faciles à synthétiser et à purifier, de molécules d'intérêt avec un monomère de PCE. Dans ce but,
20 les Inventeurs ont préparé des conjugués possédant des propriétés que ni la molécule d'intérêt, ni le monomère de PCE ne possèdent naturellement.

Dans ces conjugués, la molécule d'intérêt et le monomère de PCE sont reliés par l'intermédiaire d'une
25 chaîne oligonucléotidique, faisant office de bras espaceur entre le monomère de PCE groupe et la molécule d'intérêt considérée.

La présente invention a pour objet une macromolécule de formule (I) suivante :

30
$$\text{P-O-M} \quad (\text{I})$$

dans laquelle :

M représente une molécule d'intérêt ;

O représente une chaîne oligonucléotidique ;

P représente un monomère d'un polymère conducteur électronique.
35

Au sens de la présente invention on entend par « molécule d'intérêt », toute molécule présentant une fonctionnalité utile dans des réactions sur support solide, par exemple des réactions de synthèse, ou de
5 détection directe ou indirecte. Cette molécule d'intérêt peut être, par exemple, sans que cette liste soit limitative, une biomolécule, telle qu'une protéine (en particulier une enzyme) un acide aminé, un peptide, un glycopeptide, un lipide, un stéroïde, un glycolipide, un
10 sucre, un polysaccharide, une molécule capable de générer, directement ou indirectement, un signal, ou bien une molécule complexe, multifonctionnelle ; etc. Avantageusement, cette molécule d'intérêt constitue l'un des membres d'un couple d'affinité, il peut s'agir par
15 exemple de la biotine, ou d'un peptide potentiellement antigénique, etc.

P peut par exemple être un monomère de polyacétylène, de polyazine, de poly(p-phénylène), de poly(p-phénylène vinylène), de polypyrrène, de polypyrrrole, de
20 polythiophène, de polyfuranne, de polysélénophène, de polypyridazine, de polycarbazole, de polyaniline, etc.

Avantageusement, P est un groupe pyrrole.

La chaîne oligonucléotidique O peut être constituée d'un oligonucléotide simple-brin, ou d'un oligonu-
25 cléotide double-brin sur au moins une partie de sa longueur. Dans le deuxième cas, l'un des brins est fixé de manière covalente au monomère P, et l'autre brin est fixé de manière covalente à la molécule d'intérêt M.

De façon théorique il n'y a pas de limitation
30 dans la nature ou la longueur de l'oligonucléotide ; avantageusement, la chaîne oligonucléotidique aura une longueur comprise entre 6 et 60, préférentiellement entre 10 et 30 nucléotides. Avantageusement le pourcentage en (G+C) de l'oligonucléotide O est inférieur ou égal à 70%,
35 et de préférence inférieur ou égal à 50%.

La fixation de l'oligonucléotide O sur le monomère de PCE peut être effectuée comme décrit dans la demande PCT WO 94/22889. La fixation de la molécule d'intérêt M sur l'oligonucléotide O peut être effectuée par 5 différents procédés, connus en eux-même, permettant de lier un oligonucléotide à une autre molécule. Le choix du procédé le plus approprié dépend essentiellement de la nature de la molécule d'intérêt M.

Par exemple, l'oligonucléotide O peut être 10 activé par fixation d'un ester de N-hydroxy-succinimide d'acide aminé, d'un groupe SH [ARAR et al., Bioconjugate Chem. 6, p. 573-577, (1995)], ou d'un groupe maléimide.

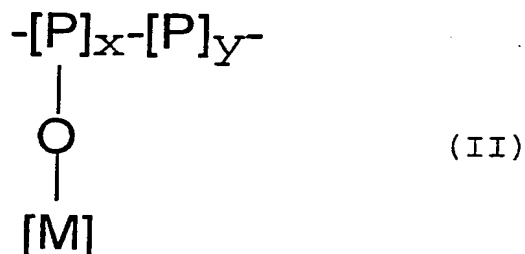
La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'une macromolécule P-O-M telle 15 que définie ci-dessus, à partir d'un mélange comprenant ladite macromolécule ainsi que les réactifs P-O et M à partir desquels elle a été formée, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape au cours de laquelle on procède au fractionnement dudit mélange, par tous moyens permettant de séparer les frac- 20 tions comprenant respectivement M et P-O-M, de la fraction comprenant P-O, et une étape au cours de laquelle l'on procède à la détection de la fraction comprenant P-O-M, et/ou à la détermination de la quantité de P-O-M par 25 détection et/ou mesure d'un paramètre associé à l'oligonucléotide O et non-associé à la molécule d'intérêt M.

La chaîne oligonucléotidique O joue, par sa nature chimique et par sa longueur, un rôle dans les propriétés physiques (polarité en chromatographie, par exem- 30 ple) du conjugué avec la molécule d'intérêt considérée, ce qui permet d'ajuster une séparation optimale du conjugué obtenu et des réactifs en excès. D'autre part, elle permet la détection spécifique du conjugué dans 35 l'ultraviolet, à une longueur d'onde comprise entre 240 et 270 nm (avantageusement, 265 nm), et éventuellement

par hybridation avec un oligonucléotide de séquence complémentaire.

Les propriétés conférées par la chaîne oligonucléotidique O permettent ainsi une manipulation aisée de quantités infimes de molécules d'intérêt, en facilitant leur séparation par des méthodes d'ultrafiltration, et/ou de chromatographie de partition, ou de chromatographie d'affinité sur des oligonucléotides de séquence complémentaire, ainsi que leur détection et leur quantification rapide par une mesure d'absorption spécifique entre 240 et 270 nm. Ceci est particulièrement avantageux lorsque la molécule d'intérêt M est un peptide ; en effet, la mesure de l'absorption des oligonucléotides à 265 nm est beaucoup plus sensible et spécifique (elle n'est pas perturbée par les sels et les solvants) que celle de l'absorption des peptides à 205 nm.

La présente invention a pour également pour objet des copolymères répondant à la formule (II) suivante :



dans laquelle P, O, et M sont tels que définis ci-dessus, et x et y représentent des nombres entiers égaux ou supérieurs à 1.

Ces copolymères peuvent être préparés par copolymérisation d'un conjugué P-O-M purifié, tel que défini ci-dessus, avec des monomères P, ou bien par fixation de la molécule d'intérêt M sur les chaînes oligonucléotidiques latérales d'un copolymère PCE/oligonucléotide, tel que ceux décrits dans la demande PCT WO 94/22889. Cette fixation peut être effectuée par

liaison covalente de la molécule d'intérêt M avec l'oligonucléotide O lui-même fixé au PCE, ou bien par l'intermédiaire d'un oligonucléotide hybridé avec ledit oligonucléotide O sur au moins une partie de sa longueur.

5 Les copolymères conformes à l'invention peuvent être utilisés dans toutes les applications dans lesquelles il est habituel de fixer des molécules d'intérêt sur un support solide, et en particulier dans la constitution de matrices de molécules d'intérêt.

10 De telles matrices peuvent être préparées en procédant à la copolymérisation électrochimique adressée, en des points différents d'une même matrice d'électrodes (chaque point étant constitué par une des électrodes de la matrice), de différents conjugués P-O-M, et/ou de
15 quantités variables d'un même conjugué P-O-M, avec les monomères P. Des électrodes constituant des points différents d'une même matrice peuvent ainsi différer entre elles par la nature, la chaîne latérale O-M, (c'est-à-dire par la séquence de l'oligonucléotide O et/ou par
20 la nature ou la composition chimique de la macromolécule M) ; elles peuvent également différer entre elles par la quantité de molécules d'intérêt M par unité de surface.

D'autres électrodes de la même matrice peuvent être recouvertes d'un copolymère PCE/oligonucléotide tels
25 que ceux décrits dans la demande PCT WO 94/22889. Selon l'utilisation envisagée ce copolymère PCE/oligonucléotide pourra être conservé tel quel, ou bien être utilisé pour la fixation d'autres molécules d'intérêt, directement, ou par hybridation avec un autre oligonucléotide portant la
30 molécule d'intérêt.

L'utilisation des macromolécules P-O-M et des copolymères conformes à l'invention permet donc l'obtention facile de matrices multifonctionnelles.

En outre, l'utilisation des conjugués P-O-M et
35 des copolymères conformes à l'invention permet d'obtenir des électrodes constituant des témoins internes,

autorisant à tout moment (après le dépôt ou en cours d'utilisation) un contrôle qualitatif ou quantitatif de la fixation des molécules d'intérêt M au support solide par l'intermédiaire de l'oligonucléotide O. Ce contrôle
5 peut être effectué de différentes manières : par exemple en détectant les chaînes oligonucléotidiques O par hybridation avec une sonde marquée, ou bien en recouvrant une ou plusieurs des électrodes de la matrice, de copolymères conformes à l'invention portant une molécule
10 d'intérêt M constituant un marqueur facile à détecter (par exemple la biotine, ou un marqueur fluorescent).

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation et d'utilisation de
15 macromolécules et de copolymères conformes à l'invention.

EXEMPLE 1 : PROPRIETES SPECTRALES ET CHROMATOGRAPHIQUES DE PEPTIDES

Pour illustrer les problèmes posés par la détection d'un peptide d'intérêt biologique, on utilise un
20 peptide synthétique commercial (réf. A2532 SIGMA-ALDRICH Chimie), de masse molaire 1652,1 Da, correspondant au fragment 11-24 de l'ACTH (adrenocortotrophic hormone). D'après le fabricant la préparation contient 61% de peptide.

25 On injecte sur une colonne RP-HPLC 25 µl d'une solution à 2 mg/ml dudit peptide. L'élution est effectuée par le mélange A + B, (A = 5% ACN (acétonitrile) 25 mM TEAAc (acétate de triéthyl ammonium) ; B = 50% ACN 25 mM TEAAc) en utilisant un gradient de 0% à 100% B en
30 35 minutes.

On observe un pic à un temps de rétention $R_t = 2$ minutes et un pic assez large à $R_t = 10$ minutes. Les fractions correspondant à ces deux pics sont collectées, concentrées et analysées.

35 La fraction F1 ($R_t = 2$ minutes) montre une absorption $A_{220 \text{ nm}} = 1,033$. D'autre part, $A_{275 \text{ nm}}$ est du même

ordre que le bruit de fond (0,005). Cette fraction contient donc des sels ($A_{220 \text{ nm}}$ non spécifique).

La fraction F2 ($R_t = 10$ minutes) présente une absorption $A_{220 \text{ nm}} = 1,90$ et $A_{275 \text{ nm}} = 0,073$. Cette fraction
5 contient donc le peptide.

Ceci illustre le fait que la détection U.V. vers 215 à 220 nm ne permet pas, à elle seule de différencier sur le chromatogramme le signal dû au peptide des signaux parasites d'autres substances.

10 On a analysé de la même façon par RP-HPLC le peptide synthétique commercial (réf. A 0673 SIGMA-ALDRICH Chimie), de masse molaire 2465,7 Da, correspondant au fragment ACTH (18-39). D'après le fabricant, l'échantillon contient 82% de peptide.

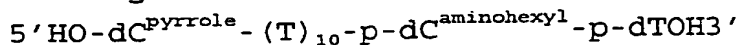
15 L'analyse HPLC est réalisée dans les mêmes conditions que ci-dessus, et les fractions sont détectées en U.V. à 215 nm.

On observe un pic majeur pour $R_t = 18,45$ minutes ; ce pic est plus fin que celui observé pour le fragment ACTH (11-24).
20

Cette expérience montre que deux fragments peptidiques différents présentent des pics caractérisés par des temps de rétention très différents. La comparaison des profils HPLC montre également que les pics, comme
25 dans le cas de ACTH (11-24), peuvent être élargis.

EXEMPLE 2 : SYNTHÈSE D'UN OLIGONUCLEOTIDE DOUBLEMENT MODIFIÉ PAR UN RESIDU PYRROLE ET UN BRAS AMINOALKYLE.

Un oligonucléotide modifié de séquence :



30 est synthétisé sur support solide (CPG (Controlled pore Glass)) par la méthode dénommée « phosphite-phosphoramidite », décrite par [BEAUCAGE et LYER, Tetrahedron., 48, 2223-2311, (1992)].

Les principales étapes de cette synthèse sont
35 indiquées ci-dessous.

On prépare un aminoalkyle-phosphoramidite dérivé de la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-N-4-(6-aminohexyl)-2'-désoxycytidine [ROGET et al. Nucleic Acids Res., 17, 7643-7650, (1989)].

5 Cet aminoalkyle-phosphoramidite est obtenu en deux étapes : l'amine primaire du bras alkylamine porté par le nucléoside est protégée par un groupe trifluoracétyle, suivie d'une phosphitylation de l'hydroxyle en 3' par un procédé analogue à celui décrit
10 par SPROAT et al. [Nucleic Acids Res. 15, 6181-6196, (1987)], pour le phosphoramidite de la 5'-trifluoracetamido-2',5'-didésoxythymidine par SPROAT et al. [Nucleic Acids Res. 15, 6181-6196, (1987)].

On couple les aminoalkyle-phosphoramidites
15 ainsi obtenus sur une colonne d'un synthétiseur d'ADN, par l'intermédiaire de thymidines préalablement fixées sur cette colonne.

D'autres aminoalkyle-phosphoramidites tels que ceux décrits par AGRAWAL et al., [Nucleic Acids. Res.,
20 14, 6227, (1986)] ; CONNOLLY, [Nucleic Acids. Res. 15, 3131, (1987)] ; BEAUCAGE et LYER, [Tetrahedron. 49, 1925-1963, (1993)] sont également utilisables.

On condense ensuite le phosphoramidite de la thymidine sur l' aminoalkyle-phosphoramidite fixé à la colonne. Cette étape est répétée jusqu'à obtention d'une
25 chaîne oligonucléotidique de 10-mères.

On condense, à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide ainsi obtenu, un phosphoramidite de la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-N-4-(6-aminohexyl)-2'-
30 désoxycytidine sur lequel a été greffé un résidu pyrrole, selon le protocole décrit dans la demande PCT WO 94/22889 et par LIVACHE et al., [Nucleic Acids Res. 22, 2915-2921, (1994)].

L'oligonucléotide est déprotégé dans
35 l'ammoniaque concentrée (16 heures à 55°C), et purifié par HPLC sur une colonne LICHROSPHER^R RP-18E 250-10

(10 μ m) (MERCK, DARMSTAT, D) par un gradient d'acétonitrile dans l'acétate de triéthylammonium 50 mM (tampon A : 5% acétonitrile, tampon B : 50% acétonitrile ; débit 5 ml/minutes, gradient de 10% B à 25% B en 20 minutes), selon la méthode décrite dans : « Oligonucleotide synthesis : A practical approach. Ed M.J. Gait. IRL Press, Oxford ».

Les fractions correspondant à un pic majoritaire (temps de rétention supérieur à 15 minutes) sont évaporées. Après évaporation, l'oligonucléotide obtenu est dessalé par filtration sur une colonne NAP-5^R (PHARMACIA-LKB Biotechnology, UPPSALA, Suède).

EXEMPLE 3 : PREPARATION D'UN OLIGONUCLEOTIDE ACTIVE SOUS LA FORME D'ESTER DE N-HYDROXY SUCCINIMIDE.

L'oligonucléotide modifié (dénommé ci-après pyr-T₁₀-NH₂) préparé selon la méthode décrite à l'exemple 2 ci-dessus, est transformé en son intermédiaire activé (ester de N-hydroxysuccinimide) correspondant selon le protocole suivant :

L'oligonucléotide pyr-T₁₀-NH₂ (10 à 25 nmol) lyophilisé est repris dans 12 μ l de tampon 50 mM N-(3-sulfopropyl)morpholine (MOPS) pH 7,0. A cette solution sont ajoutés 28 μ l de diméthylformamide contenant 4 μ mol de dissuccinimidyl subérate (DSS PIERCE ROCKFORD, IL), et le mélange est laissé sous agitation mécanique (16 heures à 4°C ou 5 heures à 20°C). On dépose le mélange réactionnel sur une colonne NAP-5 équilibrée avec de l'eau, et la colonne est éluée par de l'eau selon le protocole préconisé par le fabricant. La fraction exclue (1 ml) est extraite 5 fois par 1 ml de n-butanol. A chaque extraction, on centrifuge, on élimine la phase supérieure (organique) et on conserve la phase inférieure (aqueuse). A la dernière extraction, l'ester de N-hydroxy succinimide (dénommé ci-après pyr-T₁₀-NHS) précipité au fond du tube est séché sous vide (SPEED-VAC) puis conservé à -20°C

(préféablement moins de 24 heures) jusqu'à son utilisation.

Une HPLC analytique d'une partie aliquote du mélange réactionnel à différents temps de réaction est réalisée sur une colonne LICHROSPHER^R RP-18E/125-4 (5 µm) (MERCK, Darmstat, Allemagne) ; on effectue l'élution par un gradient d'acétonitrile dans l'acétate de triéthylammonium 50 mM (tampon A : 5% acétonitrile, tampon B : 50% acétonitrile) ; débit 1 ml/mn, gradient de 10% B à 30% B en 20 minutes, puis de 30% B à 50% B en 15 minutes. Cette analyse chromatographique montre la disparition du pic de l'oligonucléotide pyr-T₁₀-NH₂, (temps de rétention environ 19 minutes) et l'apparition d'un pic (temps de rétention environ 27 minutes) correspondant à l'ester de N-hydroxy succinimide (dénommé pyr-T₁₀-NHS).

EXEMPLE 4 : COUPLAGE D'UN OLIGONUCLEOTIDE MODIFIE SUR DES PEPTIDES

A) Couplage sur le fragment ACTH(11-24) :

20 nmol de pyr-T₁₀-NHS obtenu comme décrit dans l'exemple 3, sont repris dans 50 ml de tampon MOPS (50 mM, pH 7,8). On ajoute le peptide ACTH(11-24) (SIGMA, St Louis, Etats-Unis) (26 nmol, 1,3 eq.) dans 50 µl de tampon MOPS pH 7,8. On incube une nuit à 4°C

On observe en HPLC analytique dans des conditions identiques à celles de l'exemple 3 la disparition de pyr-T₁₀-NHS, et l'apparition d'un pic majoritaire correspondant au conjugué oligonucléotide-peptide (temps de rétention environ 26,4 minutes).

Le mélange réactionnel est purifié par HPLC-semi-préparatoire sur une colonne LICHROSPHER^R RP-18E/125-4 (5 µm) (MERCK, Darmstat, Allemagne), par un gradient d'acétonitrile dans l'acétate de triéthylammonium 50 mM. L'élution est effectuée dans les mêmes conditions que la HPLC analytique décrite à l'exemple 3.

On détecte par mesure UV à 265 nm le conjugué oligonucléotide-peptide et on le collecte dans la fraction correspondant à un temps de rétention compris entre 24 et 25,5 minutes ; cette fraction est séchée par évaporation (SPEED-VAC). On obtient ainsi environ 3,7 nmol de conjugué dénommé pyr-T₁₀-ACTH(11-24).

B) Couplage sur le fragment ACTH(18-39) :

L'oligonucléotide-ester pyr-T₁₀-NHS (EX. 3) (environ 20 nmol) est couplé avec le fragment ACTH(18-39) (environ 35 nmol soit environ 1,8 eq.) (SIGMA, St Louis, Etats-Unis), et le produit de couplage, dénommé pyr-T₁₀-ACTH(18-39), est purifié en suivant les protocoles décrits en A) ci-dessus.

Le conjugué pyr-T₁₀-ACTH(18-39) est détecté dans la fraction correspondant à un temps de rétention compris entre 26 à 27 minutes. Après séchage de cette fraction, on obtient environ 7 nmol du conjugué.

EXEMPLE 5 : SYNTHESE D'UN CONJUGUE PYRROLE-T₁₀-BIOTINE :

Un oligonucléotide modifié de séquence pyr-T₁₀-NH₂ (10 à 20 µmol) est traité par un excès de biotine-NHS (environ 50 équivalents) (SIGMA) dissous dans 20 µl de diméthyl-formamide dans un tampon carbonate (1 M) à pH 9 ; on incube pendant 30 minutes à 20°C.

Le mélange réactionnel est purifié sur une colonne d'exclusion (NAP PHARMACIA) et le conjugué pyr-T₁₀-bio (Rt = 23 minutes) est séparé de l'oligonucléotide pyr-T₁₀-NH₂ résiduel (Rt = 18 minutes) par HPLC analytiques dans les conditions de l'exemple 3. Les fractions sont détectées à 265 nm.

EXEMPLE 6 : ELECTROPOLYMERISATION DES CONJUGUES PYR-T₁₀-PEPTIDE, ET PYR-T₁₀-BIOTINE.

Les conjugués synthétisés comme décrit dans les exemples 4 A), 4 B) et 5, sont déposés, par électropolymérisation sur des micro-électrodes de silicium recouvertes d'or.

Ces micro-électrodes sont disposées de façon à former une matrice en forme de « damier » ; cette matrice est formée de micro-électrodes carrées de 50 μm de côté disposées en 5 colonnes et 4 lignes selon le schéma
5 suivant ($n = 5$ colonnes et $p = 4$ lignes). Les micro-électrodes sont repérées par leur coordonnées ($i;j$).

L'électropolymérisation est réalisée en plongeant la matrice d'électrodes dans un milieu contenant le conjugué pyrrole-oligonucléotide-biomolécule concerné, et
10 du pyrrole (rapport molaire Pyrrole/conjugué = 10 000 environ), dans une solution LiClO_4 0,1M. On relie l'électrode sur laquelle on souhaite effectuer le dépôt (par exemple à un potentiostat, et on effectue des cycles entre -0,35 V et +0,85 V (potentiels mesurés par rapport
15 à une électrode au calomel reliée à la cellule d'électrolyse et connectée au potentiostat) à une vitesse de 100 mV/s. La contre-électrode est constituée d'un fil de platine.

Certaines des micro-électrodes sont recouvertes d'un copolymère formé de polypyrrole et d'un conjugué :

- pyr- T_{10} -ACTH (18-39): électrodes (1;4) et (3;4)

- pyr- T_{10} -bio : électrodes (2;3) et (4;4).

25 Les électrodes restantes sont ou bien laissées dans leur état initial, c'est-à-dire que le dépôt d'or reste inchangé, ou bien recouvertes de polypyrrole ; ces électrodes constituent des témoins négatifs permettant d'évaluer la spécificité des réactions effectuées sur la
30 matrice.

Le tableau I ci-dessous schématise la matrice de microélectrodes, et l'emplacement des différents dépôts.

TABLEAU I

$\begin{smallmatrix} j \\ i \end{smallmatrix}$	1	2	3	4	5
1	OR	OR	OR	ACTH	OR
2	OR	OR	BIO	OR	OR
3	PP	PP	PP	ACTH	PP
4	PP	PP	PP	BIO	PP

5

OR : pas de dépôt

PP : Dépôt de polypyrrole

EXEMPLE 7 : MISE EN EVIDENCE DES BIOMOLECULES ELECTROPOLYMERISEES SUR LES ELECTRODES

La matrice d'électrodes réalisée dans l'exemple 6 est incubée en présence d'un conjugué streptavidine/phycoérythrine. L'observation sous un microscope à épifluorescence révèle que la fluorescence est localisée sur les électrodes (2;3) et (4;4). Il n'y a pas de fluorescence parasite sur les autres électrodes, ce qui montre que le conjugué pyrrole-oligonucléotide-biotine s'est fixé spécifiquement sur les électrodes cible souhaitées.

La même matrice de micro-électrodes, est incubée en présence d'un anticorps biotinylé spécifique de la partie C-terminale du peptide 18-39 de l'ACTH (anticorps ACR-17-bio : CIS BIO INTERNATIONAL) puis en présence d'un conjugué streptavidine/phycoérythrine pour révéler le produit de la réaction.

L'observation sous microscope à épifluorescence révèle que seules les micro-électrodes portant le conjugué pyrrole-oligonucléotide-ACTH, et celles portant la biotine sont fluorescentes, ce qui montre que le con-

jugué pyrrole-oligonucléotide-ACTH s'est fixé spécifiquement sur les électrodes cible souhaitées, qu'il est accessible à un anticorps, et que ses propriétés antigéniques sont conservées.

5 **EXEMPLE 8 :**

En utilisant la méthode décrite dans l'Exemple 4, on couple le fragment ACTH(18-39) sur un oligonucléotide ester de N-hydroxysuccinimide, préparé par le procédé décrit dans l'exemple 3 à partir d'un
10 oligonucléotide de séquence 5'pyr-T₉-NH₂, synthétisé suivant le protocole décrit dans l'exemple 2.

On dispose ainsi des oligonucléotides :

- I. pyr-T₁₀-ACTH(11-24)
- II. pyr-T₁₀-ACTH(18-39)
- 15 III. pyr-T₉-ACTH(18-39)
- IV. pyr-T₁₀-Biotine
- V. pyr-T₅-HCVG (formé de l'association d'un bras T₅ et d'une séquence spécifique du génome du virus HCV.

En suivant le procédé d'électropolymérisation
20 de l'exemple 6, on effectue un dépôt électrochimique des conjugués I à V sur un réseau de micro-électrodes carrées de 100 µm de côté.

On laisse certaines électrodes non recouvertes (OR) ou recouvertes de polypyrrole non modifié (PP).

25

J \ i	1	2	3	4	5	6	7	8
1	OR	IV	I	I	III	OR	V	PP
2	PP	III	II	II	IV	OR	V	OR

On incube cette plaquette de microélectrodes avec une sonde oligonucléotidique de séquence dC^{Biotine}(dA), préparée et purifiée suivant l'exemple 2, et en utilisant le phosphoramidite biotine décrit par ROGET et al.
30 [Nucleic Acids Res., 17, 7643-7650 (1989)].

L'hybridation est effectuée avec environ 8 pmoles de sonde oligonucléotidique dans 200 µl de

tampon d'hybridation (tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4 contenant 0,5 M NaCl/Tween, 30 mn à 20°C puis 30 mn à 4°C.

On révèle ensuite par incubation en présence
5 d'un conjugué streptavidine/phycoérythrine (10 mn à 4 °C) diluée au 1/20ème dans du tampon d'hybridation.

Après examen sous microscope à fluorescence, on observe que les électrodes (1;2) et (2;5) sont fortement positives, que les électrodes (1;3), (1;4),
10 (2;3) et (2;4) sont positives, alors que les électrodes (1;5) et (2;2) montrent une fluorescence plus faible ; toutes les autres électrodes et, entre autres (1;7) et (2;7) ne présentent pas de fluorescence au dessus du bruit de fond.

Le conjugué IV (pyr-T₁₀-Biotine) permet de servir de contrôle positif de révélation. Lors d'une première utilisation de la plaque, il permet de certifier la révélation par le conjugué streptavidine/phycoérythrine. Les 4 microélectrodes
20 comportant l'oligonucléotide de type P-O-M dans lequel O est un oligonucléotide de séquence T₁₀. (1;3), (1;4) (2;3) et (2;4) présentent une hybridation positive, ce qui permet de certifier que le composé de type P-O-M a été copolymérisé sur ces électrodes.

La faible hybridation observée sur les électrodes (1;5) et (2;2) et l'absence d'hybridation sur les électrodes (1;7) et (2;7) montre la sélectivité de l'hybridation et illustre la limite inférieure pour la taille de la partie oligonucléotidique du conjugué
30 permettant cette dilution par hybridation, que l'on peut estimer entre 5 et 9 nucléotides de long.

EXEMPLE 9 :

On utilise l'oligonucléotide de type P-O-M et de séquence Pyr-T₁₀-Bio décrit dans l'exemple 5, en
35 solution dans l'eau à une concentration de 140 UA₂₆₅/ml, ce qui permet de déterminer la concentration molaire,

soit 1,17 $\mu\text{mole/ml}$ (avec $\epsilon_{265}=120000$) grâce aux propriétés d'absorption dans l'U.V. de la partie O de P-O-M.

On effectue une gamme séquentielle de dilution de l'oligonucléotide (1/5 ; 1/25 ; 1/50 ; 1/250 ; 1/1250) dans de l'eau et on ajoute 10 μl de chaque dilution à 300 μl de solution de pyrrole 20 mM dans LiClO_4 0,1M.

A l'aide de solutions contenant des concentrations variables d'oligonucléotides Pyr- T_{10} -Bio on effectue des copolymérisations sur des microélectrodes comme décrit dans l'exemple 6. Le rapport molaire pyrrole/conjugué est différent pour chaque électrode.

j \ i	1	2	3	4	5	6
1	OR	1/5	1/25	1/50	1/250	1/1250
2	PP	1/5	1/25	1/50	1/250	1/1250

On effectue la révélation par une incubation dans une solution au 1/20ème de conjugué streptavidine/phycoérythrine dans un tampon BPS. 0,5 M NaCl Tween.

On observe la plaque d'électrodes sous un microscope à épifluorescence couplé à une camera CCD (HAMAMATSU), elle même connectée à un microordinateur pourvu d'un programme d'analyse d'image.

On peut fixer le temps d'exposition pour faire varier la sensibilité de la détection.

En utilisant des temps d'exposition de 0,5 s, 1 s, 2 s, 4 s, 8 s, 16 s, on observe qu'au moins les trois plots contigus (1;2), (1;3) (1;4) donnent toujours des signaux de fluorescence, qui sont d'intensité croissante (1;2 > (1;3) > 1;4). Les plots (1;1) et (2;1) permettent d'apprécier le bruit de fond).

Les signaux fournis par les plots (1;2) et (2;2), (1;3) et (2;3) etc... sont du même ordre deux à deux, ce qui permet d'apprécier la reproductibilité.

Ceci permet de montrer que les intensités de fluorescence sont corrélées avec les quantités initiales de composé de type P-O-M (quantifiées à l'origine par absorption à 265 nm) introduites dans les différentes
5 solutions d'électrolyte.

REVENDICATIONS

1) Macromolécule de formule (I):



dans laquelle :

5

M représente une molécule d'intérêt ;

O représente une chaîne oligonucléotidique ;

P représente un monomère d'un polymère conducteur électronique.

10 2) Macromolécule selon la revendication 1, caractérisée en ce que le monomère représente un groupe pyrrole.

15 3) Macromolécule selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la chaîne oligonucléotidique O est constituée d'un oligonucléotide simple-brin.

4) Macromolécule selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la chaîne oligonucléotidique O est constituée d'un oligonucléotide double-brin sur au moins une partie de sa longueur.

20

5) Macromolécule selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la chaîne oligonucléotidique O comprend au moins 6 nucléotides, et en ce que son pourcentage en (G+C) est inférieur ou égal à 70%.

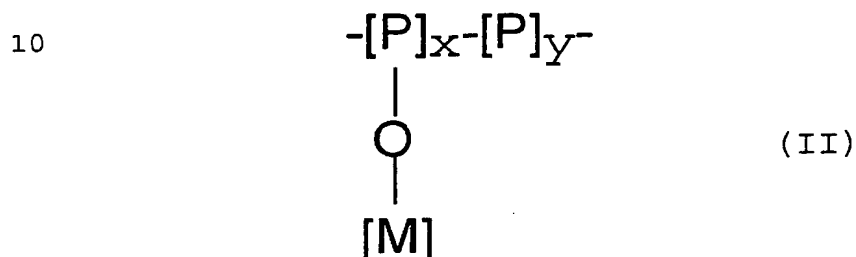
25

6) Procédé de préparation d'une macromolécule P-O-M selon une quelconque des revendications 1 à 4, à partir d'un mélange comprenant ladite macromolécule ainsi que les réactifs P-O et M à partir desquels elle a été formée, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il
30 comprend au moins une étape au cours de laquelle on procède au fractionnement dudit mélange, par tous moyens permettant de séparer les fractions comprenant respectivement M, et P-O-M, de la fraction comprenant P-O et une étape au cours de laquelle l'on procède à la détection de
35 la fraction comprenant P-O-M, et/ou à la détermination de la quantité de P-O-M par détection et/ou mesure d'un pa-

ramètre associé à l'oligonucléotide O et non-associé à la molécule d'intérêt M.

7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit paramètre associé à l'oligonucléotide O et non associé à la molécule d'intérêt M est l'absorption en ultraviolet, à une longueur d'onde comprise entre 240 et 270 nm.

8) Copolymère répondant à la formule (II) suivante :



15 dans laquelle P, O, et M sont tels que définis dans la revendication 1, et x et y représentent des nombres entiers égaux ou supérieurs à 1.

9) Electrode caractérisée en ce que sa surface est recouverte d'un copolymère selon la revendication 8.

20 10) Matrice d'électrodes, caractérisée en ce qu'au moins une des électrodes qui la constituent est recouverte d'un copolymère selon la revendication 8.

11) Matrice d'électrodes selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins deux électrodes recouvertes chacune d'un copolymère selon la revendication 8, lesdits copolymères différant entre eux par la séquence de l'oligonucléotide O et/ou par la nature ou la composition chimique de la molécule d'intérêt M.

30 12) Matrice d'électrodes selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins deux électrodes recouvertes chacune d'un copolymère selon la revendication 8, lesdits copolymères différant entre eux par la quantité de molécules d'intérêt M par unité de surface de l'électrode.

35

13) Matrice d'électrodes selon une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins une électrode recouverte d'un copolymère PCE/oligonucléotide.

5 14) Utilisation d'un copolymère selon la revendication 8 pour le contrôle de la fixation d'une molécule d'intérêt M sur une électrode.

10 15) Utilisation d'un copolymère selon la revendication 8 pour la détermination de la quantité d'une molécule d'intérêt M fixée sur une électrode.

 16) Utilisation d'un copolymère selon la revendication 8 pour le contrôle de l'adressage d'une molécule d'intérêt M sur un point déterminé d'une matrice d'électrodes.

15 17) Utilisation selon une quelconque des revendications 14 à 15, caractérisée en ce ledit contrôle met en oeuvre la mesure d'une propriété spécifique de l'oligonucléotide O.

20 18) Utilisation selon une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisée en ce que ledit contrôle met en oeuvre la mesure d'une propriété spécifique de la molécule d'intérêt M.

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche2750136^{ment}
nationalFA 530390
FR 9607846

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 116, no. 19, 1994, DC US, pages 8813-8814, XP002030299 GARNIER F. ET AL: "Enzyme recognition by Polypyrrole Functionalised with Bioactive Peptides" * le document en entier * ---	1,8
D,A	ANALYTICAL CHEMISTRY., vol. 64, no. 14, 1992, COLUMBUS US, pages 1541-1545, XP002030300 WOLOWACZ S.E. ET AL: "Covalent Electropolymerization of Glucose Oxidase in Polypyrrole" * le document en entier * ---	1,8
A	WO 95 29199 A (BIO MERIEUX) * revendications; exemples * ---	1,8,9
D,A	WO 94 22889 A (CIS BIO INTERNATIONAL) * revendications; exemples * ---	1
A	US 5 391 723 A (PRIEST J.H.) * revendications; exemples * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07H C08G G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
28 avril 1997		Day, G
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 150 (03.92) (P04C13)

This Page Blank (uspto)